

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54 (1) :42 - 52; 4 January 2014
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.01.006

罗氏真养菌 W50 的 D-木糖代谢途径工程改造

刘凯^{1,2}, 刘桂明¹, 张英姿¹, 丁久元¹, 翁维琦^{1*}

¹中国科学院微生物研究所, 北京 100101

²中国科学院大学, 北京 100449

摘要: 【目的】拓宽高产聚- β -羟基丁酸酯 (poly- β -hydroxybutyrate, PHB) 罗氏真养菌 (*Ralstonia eutropha*) W50 的碳源使用范围, 使其获得 D-木糖代谢能力。【方法】运用 PCR 技术扩增大肠杆菌 (*Escherichia coli*) K-12 W3110 来源的 D-木糖转运蛋白基因 *xylE*, 利用同源重组技术将 *xylE* 基因整合到 *R. eutropha* W50 的染色体上构建菌株 W50-E。运用 PCR 技术扩增 *E. coli* K-12 W3110 来源的 D-木糖代谢基因 *xylAB* 和 *R. eutropha* H16 来源的 PHA 合酶基因 *phaC1* 的启动子片段 P_{phaC1} , 同表达载体连接后构建重组质粒 p1-AB。将重组质粒分别转入菌株 *R. eutropha* W50 和 W50-E 中构建工程菌株 W50-AB 和 W50-EAB。通过摇瓶发酵研究 W50-AB 和 W50-EAB 的 D-木糖代谢特性。【结果】酶活分析结果表明, *xylA* 和 *xylB* 基因在菌株 *R. eutropha* W50 中得到表达。摇瓶发酵结果表明, W50-AB 在含 0.1 mol/L D-木糖的基础发酵培养基中的最大比生长速率为 0.025 h^{-1} , 在含 0.01 mol/L D-木糖的基础发酵培养基中没有生长; W50-EAB 在含 0.01 mol/L D-木糖的基础发酵培养基中表现出一定生长, 在含 0.1 mol/L D-木糖的基础发酵培养基中最大比生长速率为 0.035 h^{-1} 。PHB 含量分析结果表明, 摇瓶发酵终点时, W50-AB 和 W50-EAB 菌株内的 PHB 含量分别为细胞干重的 $15.07 \pm 1.01\%$ 和 $15.07 \pm 1.64\%$, 其相应的 D-木糖-PHB 转化率分别为 $0.0920 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $0.0838 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$, 低于两重组菌株利用葡萄糖发酵的糖-PHB 转化率 ($>0.22 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$)。另外, 重组菌株 W50-AB 和 W50-EAB 在含葡萄糖 (0.01 mol/L) 和 D-木糖 (0.09 mol/L) 的混合糖培养基中的发酵结果表明, 两重组菌株均表现出更高的生长速率和 D-木糖消耗速率以及胞内 PHB 积累量。【结论】来源于 *E. coli* K-12 W3110 菌株的 *xylAB* 基因的表达使 *R. eutropha* W50 获得了一定的 D-木糖代谢能力, 通过 D-木糖转运蛋白基因 *xylE* 的表达能提高菌株的 D-木糖代谢能力, 同时重组菌株利用 D-木糖能积累一定量 PHB。

关键词: 罗氏真养菌 (*Ralstonia eutropha*) W50, D-木糖代谢, 聚- β -羟基丁酸酯 (PHB), 转运蛋白

中图分类号: Q935 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2014) 01-0042-11

聚羟基脂肪酸酯 (polyhydroxyalkanoate, PHA) 是细菌生长条件不平衡时产生的一种渗透压惰性的高分子物质, 其作为一类新型的生物可降解材料, 在

医学、材料等领域有重要应用, 对于摆脱石化资源的依赖和环境保护具有重要意义, 其中聚- β -羟基丁酸酯 (poly- β -hydroxybutyrate, PHB) 是 PHA 中最为常

* 通信作者。Tel/Fax: +86-10-64807360; E-mail: wengwq@im.ac.cn

作者简介: 刘凯 (1987 -), 男, 湖南湘潭人, 硕士研究生, 主要从事微生物生化工程研究。E-mail: Kevinliu007@163.com

收稿日期: 2013-04-16; 修回日期: 2013-07-05

见的一种^[1]。目前 PHB 的生产主要采用微生物发酵法,其中罗氏真养菌 (*Ralstonia eutropha*) H16 是 PHB 生产的模式菌株, *R. eutropha* W50 是 *R. eutropha* H16 通过传统的遗传诱变方法筛选获得的一株 PHB 高产菌株,主要以水解淀粉来源的葡萄糖为底物进行发酵^[2],原料成本较高,若能以低成本纤维质降解液为原料进行发酵生产 PHB,能较好地降低生产成本^[3]。据分析,纤维质降解液中的糖类组份主要为:约 60% 的葡萄糖和 30% 的戊糖,其中戊糖的主要成分是 D-木糖^[4]。因此, *R. eutropha* W50 要充分利用纤维质水解液合成 PHB,使其具备 D-木糖的代谢能力是必要的。

目前已知的 D-木糖代谢途径主要有两类:(1) D-木糖经木糖异构酶 (xylose isomerase, XI) 转化为 d-木酮糖,再在木酮糖激酶 (Xylulokinase, XK) 的作用下,d-木酮糖转化为木酮糖-5-P 后,进入戊糖磷酸途径,此类途径主要存在于大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 等原核生物体内;(2) D-木糖经 NADPH 依赖性的木糖还原酶 (Xylose reductase) 还原为木糖醇,木糖醇由 NAD⁺ 依赖性的木糖醇脱氢酶 (Xylitol dehydrogenase) 氧化为 d-木酮糖,d-木酮糖再在木酮糖激酶的催化作用下,转化为木酮糖-5-P,最后进入戊糖磷酸途径^[5-6],此类途径主要存在于酵母菌等真核微生物体中。真核微生物体内的 D-木糖代谢酶由于具有辅酶因子依赖性,因此容易受胞内氧化还原平衡和辅酶因子供给状态的影响。关于酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 和原核细菌如谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*)、运动发酵单胞菌 (*Zymomonas mobilis*) 等的 D-木糖代谢改造的研究^[7-10]表明,除具备有效的 D-木糖代谢途径之外,菌株吸收和转运 D-木糖进入胞内的能力也是制约 D-木糖利用效率的关键因素,引入 D-木糖特异性转运蛋白对提高 D-木糖吸收效率具有较好的作用^[11-13]。除了隶属于 MFS 家族的 H⁺-共运输体 XylE 和隶属于 ABC 超家族的 XylFGH 转运蛋白复合体对 D-木糖具有特异且较高的转运活性外,某些己糖转运蛋白对 D-木糖的转运也有一定活性^[11]。真核细菌来源的蛋白在原核体系内(由于缺少翻译后修饰或错误折叠等原因)可能无法获得活性表

达,因此在原核细菌内构建 D-木糖代谢途径时选择原核细菌来源的 D-木糖代谢基因进行表达可能更为有利。目前已知的具天然的 D-木糖代谢能力的原核细菌有很多, *E. coli* K-12 W3110 是具有第一类 D-木糖代谢途径的野生型菌株,其编码 XI 的基因 *xylA* 和编码 XK 的基因 *xylB* 位于同一操纵子内,由同一个启动子调控表达,而编码 D-木糖转运蛋白复合物 3 个亚基的基因 *xylF*、*xylG*、*xylH* 则共同形成一个操纵子。另一个 D-木糖特异转运蛋白 XylE 是一类 H⁺-共运输体,其表达受独立的启动子调控^[11,14-18]。由于大肠杆菌 (*Escherichia coli*) K-12 W3110 胞内的 D-木糖代谢途径和转运蛋白及相关调控都研究得比较清楚,现有的一些原核细菌相关的 D-木糖代谢改造研究大都以大肠杆菌来源的 D-木糖代谢酶基因作为遗传操作靶点^[8-10]。此外,在 *E. coli* K-12 W3110 内存在对操纵子 *xylAB* 和 *xylFGH* 的启动子具严格正调控的蛋白因子 XylR,异源表达 *xylAB* 基因时应避免表达体系内可能缺乏该调节因子从而使 *xylAB* 基因自身的启动子无法获得识别的情况^[18]。不同于大肠杆菌等一些研究得比较透彻的细菌,关于 *R. eutropha* 菌株内调节基因表达的启动子的相关研究还不多,来源于 *R. eutropha* H16 的 PHA 合酶基因的启动子 P_{phaCl} 已经研究得比较清楚,在 *R. eutropha* 菌株内表达外源基因时,也通常被用作外源基因的启动子^[19-20]。

R. eutropha 模式菌 H16 的全基因组测序已于 2006 年完成,通过对其基因组的研究发现,除一个推测性的结构基因能编码将 D-木糖还原成木糖醇的醛糖还原酶 [EC:1.1.1.21] 外,还没有其他 D-木糖相关代谢基因的报道^[21],其 D-木糖代谢途径工程改造的研究也未见报道。本研究通过在 *R. eutropha* W50 中引入源自 *E. coli* K-12 W3110 的 D-木糖代谢酶系及转运蛋白,研究了其利用 D-木糖生长和积累 PHB 的能力。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 本实验所用菌株和质粒见表 1。

表 1. 实验所用的菌株和质粒

Table 1. The strains and plasmids used in this work

strains or plasmids	characteristics	source
Strains		
<i>E. coli</i> DH5 α	ϕ 80 LacZ Δ M15, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i>	stored in this lab
<i>E. coli</i> K-12 W3110	wild type, F ⁻ , λ ⁻ , <i>rph</i> ⁻	Bachmann BJ ^[22]
<i>E. coli</i> S17-4	<i>recA</i> , <i>proA</i> , <i>thi-1</i> , <i>tra</i> gene from RP4 plasmid	Simon R ^[23]
S17-pJQGE	<i>E. coli</i> S17-4 carrying plasmid pJQ-GE	this study
<i>R. eutropha</i> H16	wild type, model bacterium for PHB production	this lab
<i>R. eutropha</i> W50	mutant of <i>R. eutropha</i> H16	this lab
W50-AB	<i>R. eutropha</i> W50 carrying expression vector p1-AB	this study
W50-3433	<i>R. eutropha</i> W50 carrying plasmid pBBR1MCS	this study
W50-E	<i>R. eutropha</i> W50 with the homologous recombination of <i>xylE</i> gene	this study
W50-EAB	W50-E carrying expression vector p1-AB	this study
plasmids		
pMD19-T	T-vector, 2.7 kb, Amp ^R , <i>lacZ</i>	TaKaRa Co.
pJQ200mp18Tc	6.7 kb, <i>sacB</i> , <i>oriV</i> , <i>oriT</i> , <i>traJ</i> , Tc ^R	Quandt J ^[24]
pJQ-GE	pJQ200mp18Tc containing 3001bp fragment of <i>xylE</i> gene and <i>gabD4</i> gene	this study
pBBR1MCS	4.7 kb, Cm ^R , MCS (<i>Kpn</i> I, <i>Hind</i> III, <i>Xba</i> I), shuttle vector for <i>E. coli</i> DH5 α and <i>R. eutropha</i> W50	Kovach ME ^[25]
pBBR-C1	pBBR1MCS containing 443bp PCR fragment of <i>P_{phaC1}</i>	this study
p1-AB	pBBR-C1 containing 2900bp PCR fragment of <i>E. coli</i> K-12 W3110 <i>xylAB</i> gene	this study

gabD4: succinate semialdehyde dehydrogenase 4 gene from *R. eutropha* H16, *P_{phaC1}*: the promoter of *phaC1* gene from *R. eutropha* H16

1.1.2 主要试剂:主要分子生物学酶均购自宝生物(大连)有限公司(TaKaRa)和New England BioLabs(NEB)公司;L-乳酸脱氢酶和d-木酮糖均购自SIGMA-ALDRICH公司,丙酮酸激酶购自生工生物工程(上海)股份有限公司,其余生化药品为进口或国产分析纯试剂。

1.1.3 培养基和培养条件:①PN培养基,用于培养*R. eutropha* H16及W50:每升含蛋白胨10g,酵母粉5g,硫酸铵5g,葡萄糖酸钠5g,pH7.0;②添加20%蔗糖的PN培养基,作为同源重组实验中第2次交换的筛选培养基;③基础发酵培养基(不含酵母粉)的配方见参考文献[2];④D-木糖发酵培养基即在基础发酵培养基内添加适量的D-木糖作为唯一碳源。⑤葡萄糖培养基即在基础发酵培养基内添加适量葡萄糖。⑥D-木糖-葡萄糖混合糖培养基即在基础发酵培养基内添加适量D-木糖和葡萄糖

使两种糖的终浓度分别为0.09mol/L和0.01mol/L。若要制备固体培养基,按1.2%的量加入琼脂粉。*E. coli*在37℃培养,*R. eutropha* H16和W50在30℃培养。抗生素使用浓度为:氨苄青霉素100μg/mL,氯霉素20μg/mL,四环素5μg/mL。

1.2 DNA操作

质粒提取和染色体提取参照文献[26]及有关公司提供的试剂盒操作手册进行。*E. coli*转化采用CaCl₂法,*R. eutropha* W50转化采用电击法和接合转移法^[23,27]。

1.3 目的基因的PCR扩增

根据同源性,参照*R. eutropha* H16的*phaC1*基因启动子序列和*gabD4*基因序列以及*E. coli* K-12 W3110的*xylE*和*xylAB*基因设计4对引物(表2),引物P1和P2用于扩增*phaC1*启动子,引物P3和P4用于扩增*xylAB*结构基因,引物P5和P6用于扩

表 2. 实验所用引物序列

Table 2. Primers for gene amplification

primers	sequences (5'→3')	size /bp	restriction site
P1	ACGGGTACCAATTCATCCTTCTCGCCTATGCTCT	34	<i>Kpn</i> I
P2	ACGAAGCTTGATTTGATTTCTCTCTGCCC	29	<i>Hind</i> III
P3	ACGAAGCTTATGCAAGCCTATTTTGACCA	29	<i>Hind</i> III
P4	ACGTCTAGAAATATATAGATGTGAATTATCCCCCA	34	<i>Xba</i> I
P5	ATCTAGACCCACCAGGAGAACACAC	25	<i>Xba</i> I
P6	ACTGCAGCGGCAACTACCAGATCGT	25	<i>Pst</i> I
P7	ACGTCTAGACCCGGCTCCACGGAGCGCCTTTTTTCTT	39	<i>Xba</i> I, <i>Sma</i> I
P8	ACGCCGCGCCCGGTTACTGGTGATCACCTGTGGCTG	39	<i>Sac</i> II, <i>Sma</i> I

Underlined bases indicate restriction sites.

增 *gabD4* 基因 (包括 *gabD4* 结构基因及下游片段约 600 bp), 并用于进行 *xylE* 基因重组菌株的 PCR 验证, 引物 P7 和 P8 用于扩增 *xylE* 基因 (包括上游启动子片段约 300 bp)。

引物设计采用软件 Primer Premier 5.0, 引物合成由上海生工生物工程技术服务有限公司完成。

1.4 *xylAB* 表达载体以及 *xylE* 整合载体的构建

经 PCR 扩增获得 P_{phaCl} 片段 (443 bp) 和 *xylAB* 结构基因片段 (2897 bp), 将其分别插入载体 pBBR1MCS 的多克隆位点内获得大小为 7981 bp 的表达载体 p1-AB。经 PCR 扩增获得 *xylE* 基因片段 (1876 bp) 和 *gabD4* 基因片段 (2008 bp), *gabD4* 基因片段同载体 pMD19-T 连接后以 *Sma* I 进行酶切消化, 回收大片段后与同样经 *Sma* I 酶切消化后的 *xylE* 基因片段连接从而使 *xylE* 基因插入到 *gabD4* 基因片段内, 将插入有 *xylE* 基因的 *gabD4* 基因片段同敲除载体 pJQ200mp18Tc 连接, 获得大小为 9717 bp 的整合载体 pJQ-GE。

1.5 酶活测定方法

1.5.1 粗酶液的制备: 见参考文献 [8], 蛋白质含量测定参考文献 [28]。

1.5.2 木糖异构酶酶活测定: 采用半胱氨酸-吡唑法^[29], 在标准反应混合物中, 酶的活力单位定义为每分钟催化产生 1 nmol d-木酮糖所需的酶量。

1.5.3 木酮糖激酶的酶活测定: 见参考文献 [30]。在标准反应混合物中, 酶的活力单位定义为每分钟催化 1 μ mol d-木酮糖转化为木酮糖-5-磷酸所需的酶量。

1.6 D-木糖的吸收测定^[31]

将 *R. eutropha* H16 和 W50 分别接种于 PN 培养基中, 于 30 $^{\circ}$ C 培养至对数生长中后期, 收集菌体, 用基础发酵培养基洗涤 2 次, 重悬浮于适量基础发酵培养基中 (OD_{600} 为 8 - 10), 30 $^{\circ}$ C 温育, 饥饿处理 2 h。离心收集菌体并重悬浮于 8 mmol/L 的 D-木糖发酵培养基中, 不同时间取样, 分析发酵液中的 D-木糖浓度。

1.7 发酵实验

1.7.1 摇瓶发酵: 将 *R. eutropha* H16 和 W50, W50-3433, W50-AB 以及 W50-EAB 分别接种于 PN 培养基中, 于 30 $^{\circ}$ C 培养至对数生长中后期, 收集菌体, 用基础发酵培养基洗涤 2 次后重悬浮于适量基础发酵培养基, 按照 5% 的接种量接种于 D-木糖浓度分别

为 0.01 mol/L 和 0.1 mol/L 的基础发酵培养基中培养, 以考察各菌株利用 D-木糖的发酵特性。将 W50-3433, W50-AB 和 W50-EAB 以相同接种量接种于葡萄糖浓度为 0.1 mol/L 的⑤号培养基中培养, 以考察各菌株利用葡萄糖的发酵特性。另外, 将 W50-AB 和 W50-EAB 以相同接种量接种于⑥号培养基中培养, 以考察重组菌株利用混合糖的发酵特性。对各摇瓶发酵体系均适时取样分析。

1.7.2 生物量的测定: 发酵液用蒸馏水适当稀释, 测定 600 nm 处的光密度。

1.7.3 最大比生长速率: 见参考文献 [32]。

1.7.4 D-木糖的测定: 发酵液经离心后, 取上清用 0.45 μ m 微孔膜过滤, 采用高效液相色谱仪 LC1200 测定木糖浓度。分析条件见参考文献 [14]。

1.8 PHB 含量测定

采用气相色谱分析, 分析条件见参考文献 [33]。

2 结果和分析

2.1 *R. eutropha* H16 和 W50 的 D-木糖代谢

为了研究 *R. eutropha* H16 和 W50 的 D-木糖利用能力, 我们考察了两菌株在 D-木糖发酵培养基中的生长情况, 同时测定了短时间内两菌株的 D-木糖吸收变化。结果显示 *R. eutropha* H16 和 W50 在 D-木糖发酵培养基中均没有生长; 在 D-木糖吸收测定中, 在含 8 mmol/L D-木糖的培养基中, 5 h 内 2 菌株的胞外 D-木糖浓度没有变化。初步表明 *R. eutropha* H16 和 W50 不具有 D-木糖代谢能力以及在低浓度 (8 mmol/L) D-木糖培养基中不具 D-木糖吸收能力。

2.2 重组菌株 W50-AB 和 W50-EAB 的构建

将表达载体 p1-AB 电击转化 *R. eutropha* W50, 筛选获得的转化子命名为 W50-AB。以 S17-pJQGE 为供体菌, 将整合载体 pJQ-GE 接合转移至 *R. eutropha* W50 胞内, 利用同源重组的方法将 *xylE* 基因整合到 *R. eutropha* W50 染色体的 *gabD4* 基因位点上, 筛选获得的转化子命名为 W50-E。将表达载体 p1-AB 电击转化 W50-E, 获得重组菌株命名为 W50-EAB。

2.3 W50-AB 的木糖异构酶及木酮糖激酶酶活测定

为了验证外源的 *xylAB* 基因是否在 *R. eutropha*

W50 内获得表达,我们首先对 W50-AB 的木糖异构酶和木酮糖激酶活性分别进行了测定,其 XI 的比活力为 33.74 ± 1.02 U/mg, XK 的比活力为 0.39 ± 0.02 U/mg,两种酶都检测到了明显的活力,表明 *xylAB* 基因在 *R. eutropha* W50 中实现了表达。

2.4 W50-AB 分别以 D-木糖和葡萄糖为底物的发酵

为了研究 *xylAB* 基因的表达能否使重组菌株 W50-AB 获得 D-木糖代谢能力,我们对 W50-AB 进行了以 D-木糖为底物的摇瓶发酵实验,考察了其细

胞生长和 D-木糖消耗变化。结果表明,W50-AB 在含 0.01 mol/L D-木糖的基础发酵培养基中不能生长,但在含 0.1 mol/L D-木糖的基础发酵培养基中表现出明显的生长,最终生物量显著高于对照菌 W50-3433,最大比生长速率为 0.025 h⁻¹ (图 1-A), D-木糖浓度也出现明显降低(图 1-B)。表明培养基中的 D-木糖得到利用,*xylAB* 基因的表达使 W50-AB 获得了一定的 D-木糖代谢能力。但 W50-AB 的 D-木糖代谢速率显著低于其葡萄糖的代谢速率。

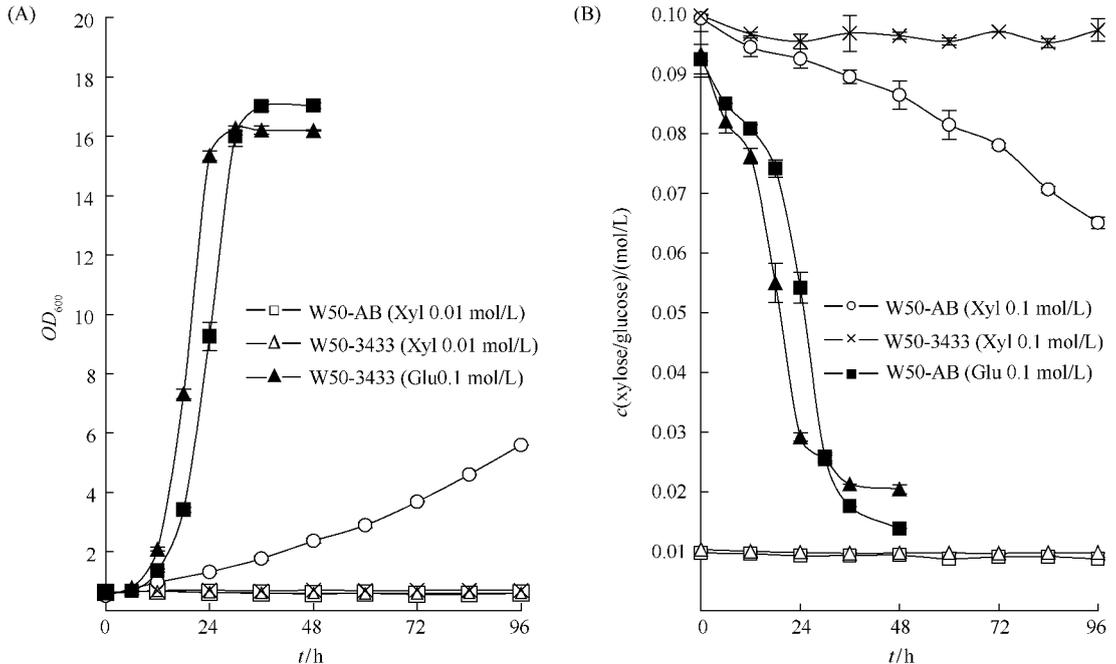


图 1. W50-AB 和 W50-3433 利用 D-木糖发酵的生长 (A) 和糖耗 (B) 曲线

Figure 1. Time courses of the fermentation of W50-AB and W50-3433 using D-xylose as substrate. The fermentation of W50-AB and W50-3433 using glucose (0.1 mol/L) as substrate was presented for a comparison. A: cell growth profiles; B: sugar consumption profiles. Xyl: the concentration of D-xylose in the minimal medium; Glu: the concentration of glucose in the minimal medium.

2.5 W50-EAB 分别以 D-木糖和葡萄糖为底物的发酵

xylAB 基因的胞内表达虽然使 *R. eutropha* W50 获得了一定的 D-木糖代谢能力,但其在含 0.01 mol/L D-木糖的培养基中不能生长,在含 0.1 mol/L D-木糖的培养基中也生长缓慢,因此我们期望在 W50-AB 内同时表达 D-木糖特异性转运蛋白 XylE 以提高菌株的 D-木糖代谢效率。

对 W50-EAB 进行 D-木糖摇瓶发酵,结果显示(图 2-A 和 2-B),在含 0.01 mol/L D-木糖的基础发酵培养基上 W50-EAB 出现了明显生长,其最终生

物量显著高于 W50-AB 并伴有明显的 D-木糖消耗。在含 0.1 mol/L D-木糖的基础发酵培养基中,W50-EAB 的生长速率略高于 W50-AB,最大比生长速率为 0.035 h⁻¹,在发酵 60 h 后其 D-木糖消耗速率也要略快于 W50-AB,说明 *xylE* 基因在 W50-EAB 内得到表达,并且在一定程度上提高了菌株的 D-木糖代谢效率。但 W50-EAB 的 D-木糖代谢速率显著低于其葡萄糖的代谢速率。

2.6 W50-AB 和 W50-EAB 利用 D-木糖和葡萄糖混合糖的发酵

木质纤维素降解液中最主要的成分是葡萄

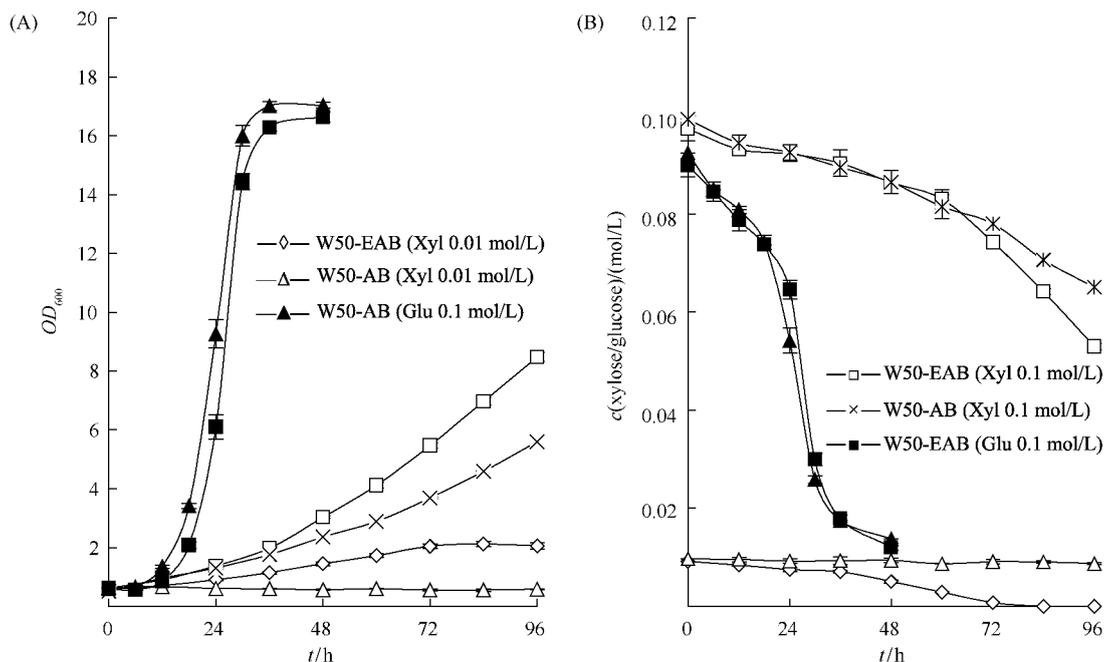


图 2. W50-AB 和 W50-EAB 利用 D-木糖发酵的生长 (A) 和糖耗 (B) 比较

Figure 2. Comparison of the fermentation using D-xylose as substrate between W50-AB and W50-EAB. The fermentation of W50-AB and W50-EAB using glucose (0.1 mol/L) as substrate was presented for a comparison. A: cell growth profiles; B: sugar consumption profiles. Xyl: the concentration of D-xylose in the minimal medium; Glu: the concentration of glucose in the minimal medium.

糖和 D-木糖,为了初步了解重组菌株在葡萄糖和 D-木糖混合糖中的发酵特性,我们也考察了 W50-AB 和 W50-EAB 在少量葡萄糖和 D-木糖的共混液中的菌体生长和糖耗变化情况。结果显示, W50-AB 和 W50-EAB 在⑦号培养基中的最终生物量均有显著地提高(图 3-A),其在 96h 内的平均 D-木糖消耗速率也均有不同程度地提高(图 3-B)。另外,在发酵约 16 h ~ 24 h 期间(图 3-B 中两条纵向虚线所包含区域),当培养基中还存在一定浓度的葡萄糖时, W50-AB 和 W50-EAB 均出现了不同程度地 D-木糖消耗,提示在此种混合糖(含 0.01 mol/L 葡萄糖和 0.09 mol/L D-木糖)培养基条件下, W50-AB 和 W50-EAB 可能是同时利用 D-木糖和葡萄糖。

2.7 PHB 含量测定

上述结果表明,带有 D-木糖代谢酶基因的重组菌株 W50-AB 及同时带有 D-木糖代谢酶基因和 D-木糖特异转运蛋白基因的重组菌 W50-EAB 可以在

以 D-木糖为唯一碳源的培养基中生长。我们进一步考察了这两株重组菌利用 D-木糖积累 PHB 的能力。结果显示, W50-AB 和 W50-EAB 在含 0.1 mol/L D-木糖的基础发酵培养基中积累的 PHB 分别占菌体干重的 $15.07 \pm 1.01\%$ 和 $15.07 \pm 1.64\%$ (图 4-A),表明重组菌株能够利用 D-木糖积累一定量 PHB。但与以葡萄糖为底物发酵时相比, PHB 含量还较低。 W50-AB 和 W50-EAB 利用 D-木糖发酵的糖-PHB 转化率分别为 $0.0920 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $0.0838 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$,也低于两重组菌株利用葡萄糖发酵的糖-PHB 转化率(图 4-B)。

另外, W50-AB 和 W50-EAB 在混合糖培养基中积累的 PHB 分别占菌体干重的 $26.23 \pm 1.8\%$ 和 $28.5 \pm 1.2\%$,显著高于其在纯 D-木糖培养基中积累的 PHB 含量(图 5)。表明重组菌株在含少量葡萄糖的 D-木糖培养基中的 PHB 积累能力得到显著改善。

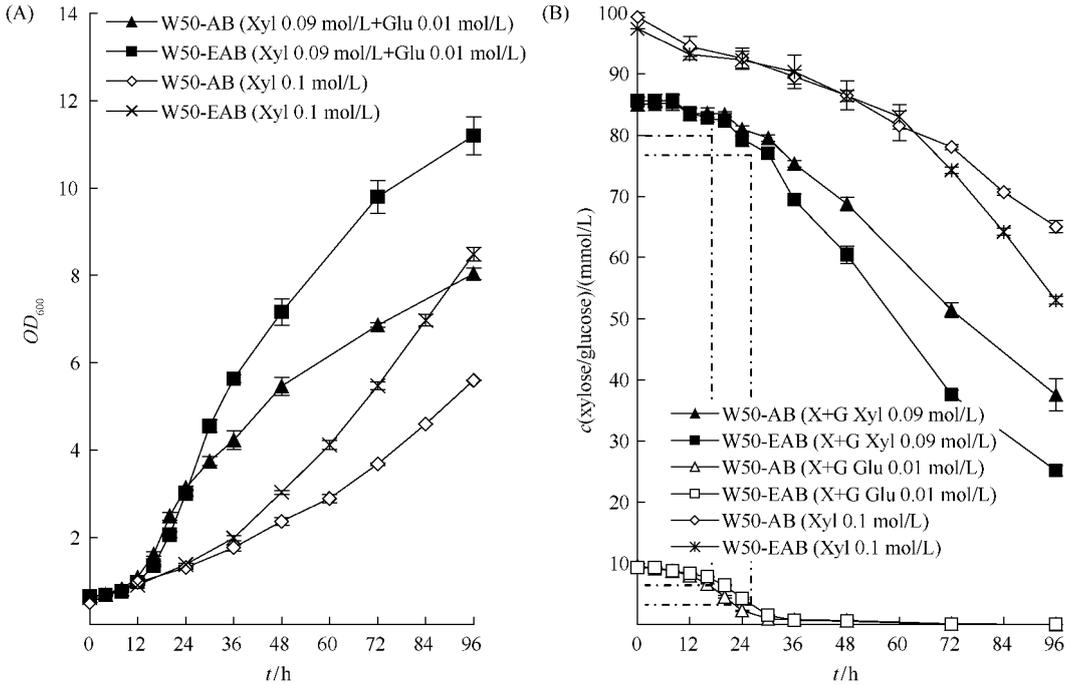


图 3. W50-AB 和 W50-EAB 在混合糖培养基中的生长 (A) 和糖耗 (B) 曲线

Figure 3. Time courses of the fermentation of W50-AB and W50-EAB using D-xylose (0.09 mol/L) and glucose (0.01 mol/L) mixed sugars as substrate. A. cell growth profiles; B. sugar consumption profiles. Xyl: D-xylose; Glu: glucose; X + G: D-xylose and glucose mixed sugars in the minimal medium.

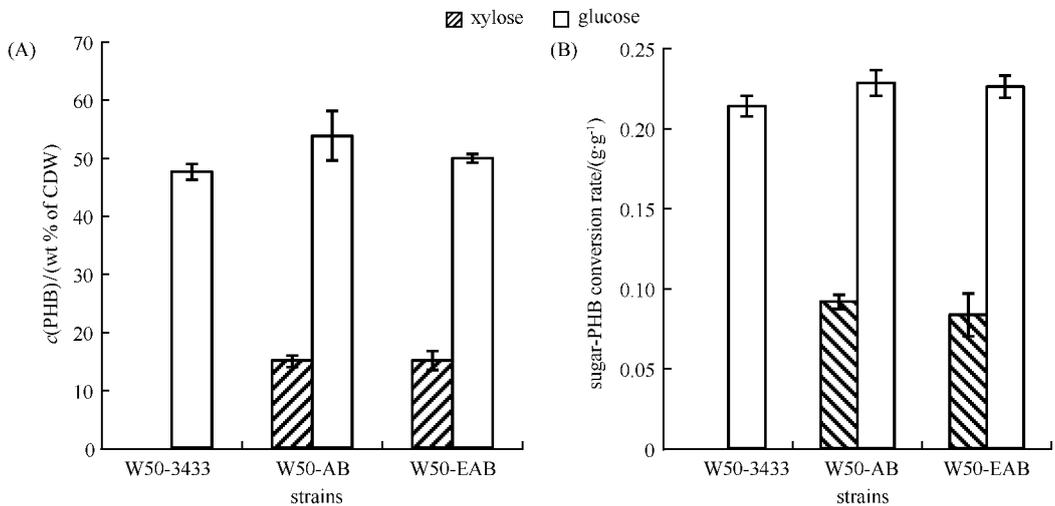


图 4. W50-AB 和 W50-EAB 利用 D-木糖发酵的 PHB 含量 (A) 和糖-PHB 转化率 (B)

Figure 4. PHB contents and sugar-PHB conversion rates of W50-AB and W50-EAB using D-xylose (0.1 mol/L) as substrate. PHB contents and sugar-PHB conversion rates of W50-3433, W50-AB and W50-EAB using glucose (0.1 mol/L) as substrate were presented for comparison. CDW: cell dry weight.

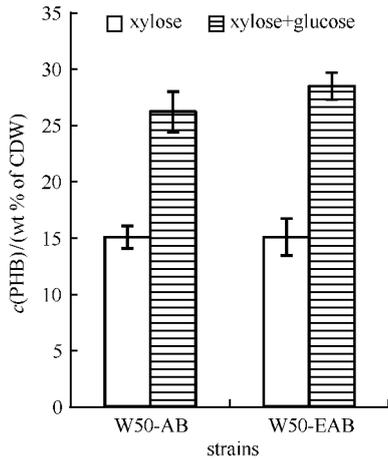


图 5. W50-AB 和 W50-EAB 利用混合糖发酵的 PHB 积累量

Figure 5. PHB contents of W50-AB and W50-EAB using mixed sugars as substrate. PHB contents of W50-AB and W50-EAB using D-xylose (0.1 mol/L) as substrate were presented for comparison.

3 讨论

本工作是首次尝试在 PHB 高产菌株 *R. eutropha* W50 内构建外源的 D-木糖代谢途径。首先, 我们通过在 *R. eutropha* W50 胞内成功地表达外源 D-木糖代谢基因 *xylAB* 即使菌株获得了 D-木糖代谢能力, 表明 *R. eutropha* W50 本身存在一定的 D-木糖转运活性。关于不同菌株中糖转运蛋白的研究表明, 多种微生物胞内均存在对 D-木糖具低亲和力的非特异性己糖转运蛋白^[11]。由于重组菌株 W50-AB 不能在含 0.01 mol/L D-木糖的培养基中生长, 而能够在含 0.1 mol/L D-木糖的培养基中生长, 因此推测 *R. eutropha* 菌株中的 D-木糖转运也是由这类转运蛋白介导的。另外, D-木糖吸收测定结果显示, 在 8 mmol/L 的 D-木糖培养基中 *R. eutropha* H16 和 W50 不具有 D-木糖的吸收能力, 这也揭示了 H16-AB 和 W50-AB 不能在含 0.01 mol/L D-木糖的培养基中生长的原因可能是 *R. eutropha* 菌株缺乏特异的高亲和力的 D-木糖转运蛋白。

在 *R. eutropha* 菌株胞内有 4 个琥珀酸半醛脱氢酶, 其中 *gabD4* 基因编码的同工酶不参与主要的细胞能量代谢以及 PHB 合成代谢, 对 *R. eutropha* W50 的 *gabD4* 基因进行敲除后的发酵结果也表明,

菌株的生长和 PHB 积累没有受到影响 (未发表数据)。因此我们进一步将 D-木糖特异转运蛋白基因 *xylE* 整合到 *gabD4* 基因在染色体上的位点进行表达。*xylE* 基因的整合表达提高了 *R. eutropha* W50 利用 D-木糖的能力, 表明 D-木糖特异性转运蛋白对菌株 D-木糖代谢的重要性。*E. coli* K-12 W3110 的 D-木糖特异转运蛋白复合物 XylFGH 相对于 H⁺-共转运体蛋白 XylE 对 D-木糖显示出更高的转运活力^[11-15], 若能成功表达此转运蛋白复合物, 推测将更大程度提高 *R. eutropha* W50 的 D-木糖利用效率, 因此该转运蛋白复合物基因 *xylFGH* 的表达是本研究下一步将要尝试的工作。

Sukgil Song 和 Chankyu Park 的研究表明, *E. coli* 内的 D-木糖代谢基因操纵子 *xylAB* 可能受调节因子 XylR 严格地正调控^[18]。由于 *R. eutropha* 胞内缺乏 XylR 因子, 为了防止外源基因无法在 *R. eutropha* W50 内表达, 我们采用了 *R. eutropha* 菌株本身的组成型启动子 *P_{phaCl}*^[19] 成功地使 *xylAB* 基因获得表达。从酶活结果分析来看, XI 和 XK 都检测到了明显的活力, 但其酶活力依然有很大的提升空间, 采用表达能力更强的启动子如 *P_{tac}* 等将是进一步提高外源基因表达水平的重要策略之一^[20]。

重组菌株 W50-AB 和 W50-EAB 均能利用 D-木糖积累一定量的 PHB, W50-EAB 相对于 W50-AB 虽然表现出更高的生物量积累, 但其胞内积累的 PHB 含量并没有明显提高, 具体原因还有待进一步研究。*R. eutropha* 菌株具有比较高效的己糖代谢酶系^[34], *R. eutropha* W50 是经过诱变获得的能够高效利用葡萄糖生长并积累 PHB 的突变株, 但其戊糖磷酸途径代谢可能相对并不活跃, 因而使重组菌株 W50-AB 和 W50-EAB 的 D-木糖代谢速率可能受到一定程度地限制, 加强戊糖磷酸途径中 d-木酮糖-5-磷酸下游的关键酶的表达, 有可能提高菌株的 D-木糖利用速率^[7]。重组菌株利用纯 D-木糖发酵积累的 PHB 含量以及糖-PHB 转化率均显著低于其以葡萄糖为底物时的数据。Sylvaine Le Meur 等^[32] 在其研究中发现, 对获得 D-木糖代谢能力的重组 *Pseudomonas putida* KT2440 菌株进行 D-木糖发酵后的产物分析发现, 发酵液中存在大量乙酸, 因此推测工程菌代谢 D-木糖后大量碳流向乙酸生成途径。

进入重组菌株 W50-AB 和 W50-EAB 胞内的 D-木糖是否也大量流向非 PHB 合成途径还需要进一步的研究。

在添加少量葡萄糖的混合糖培养基中,重组菌株的 D-木糖消耗速率及最终积累的 PHB 含量均有显著提高,由于重组菌株 W50-AB 和 W50-EAB 在纯木糖培养基中的生长比较缓慢,而 *R. eutropha* W50 作为受体菌其本身能够高效利用葡萄糖,因而可以在发酵的初始阶段利用葡萄糖进行较快生长、菌体量快速增多进而能够较大幅度地提高 W50-AB 和 W50-EAB 的 D-木糖消耗速率。另外,葡萄糖的存在可能改变了重组菌株胞内的能量代谢和氧化还原平衡状态,如辅酶因子 NADPH 的供给增多很可能促进 PHB 合成途径中 NADPH 依赖性的乙酰乙酰-CoA 还原酶的活性,从而使菌株的胞内环境更有利于 PHB 的积累,因而最终能显著提高重组菌株积累的 PHB 含量。具有葡萄糖特异性 PTS (the phosphoenolpyruvate [PEP]: carbohydrate phosphotransferase system) 系统的菌株利用混合碳源进行发酵时,二级糖的吸收往往会受到葡萄糖的抑制,这对于发酵生产中提高生产率是不利的。已有研究发现 *R. eutropha* 菌株可能不具有葡萄糖特异性 PTS 系统,其葡萄糖吸收和转运主要通过 *N*-乙酰葡萄糖胺-特异性的 PTS 转运系统来完成,而且该转运系统中可能介导 CCR (Carbon catabolite repression) 效应的蛋白因子并未参与葡萄糖的磷酸化,其葡萄糖的磷酸化过程主要由葡萄糖激酶 (glucokinase, GLK) 介导^[35]。因此我们推测重组菌株 W50-AB 和 W50-EAB 利用葡萄糖和 D-木糖混合碳源时可能不存在葡萄糖效应。对 W50-AB 和 W50-EAB 利用混合糖发酵过程中 D-木糖和葡萄糖的浓度变化进行观察的结果提示,两个重组菌株可能同时利用发酵液中的 D-木糖和葡萄糖。但是重组菌株的 D-木糖吸收是否不受葡萄糖的抑制作用还需要通过葡萄糖比例更高的混合糖发酵进一步确认。

本研究首次在 PHB 高产菌株 *R. eutropha* W50 内成功地构建了外源的 D-木糖代谢途径,获得了具有一定 D-木糖利用能力并积累 PHB 的重组菌株,对于进一步扩展该菌株的碳源利用范围具有一定的

指导意义。

参考文献

- [1] 陈国强, 罗荣聪, 徐军, 吴琼. 聚羟基脂肪酸酯生态产业链——生产与应用技术指南. 北京: 化学工业出版社, 2008: 1-19.
- [2] Yi Z, Huang H, Weng W, Chen Q, Chen D, Zheng P. Studies on poly- β -hydroxybutyrate by the mutant 65-7 of *Alcaligenes eutrophus*. *Microbiology China*, 1995, 22 (1): 29-31. (in Chinese)
易祖华, 黄和容, 翁维琦, 陈琦, 陈东, 郑平弟. 真产碱杆菌突变株 65-7 产聚- β -羟基丁酸的研究. *微生物学通报*, 1995, 22 (1): 29-31.
- [3] Hahn-Hagerdal B, Galbe M, Gorwa-Grauslund MF, Liden G, Zacchi G. Bio-ethanol—the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends in Biotechnology*, 2006, 24(12): 549-556.
- [4] Lee J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *Journal of Biotechnology*, 1997, 56: 1-24.
- [5] Bettiga M, Hahn-Hagerdal B, Gorwa-Grauslund MF. Comparing the xylose reductase/xylytol dehydrogenase and xylose isomerase pathways in arabinose and xylose fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Biotechnology for Biofuels*, 2008, 1(1): 16.
- [6] Karhumaa K, Garcia Sanchez R, Hahn-Hagerdal B, Gorwa-Grauslund MF. Comparison of the xylose reductase-xylytol dehydrogenase and the xylose isomerase pathways for xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories*, 2007, 6: 5.
- [7] Hahn-Hagerdal B, Karhumaa K, Jeppsson M, Gorwa-Grauslund MF. Metabolic engineering for pentose utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 2007, 108: 147-177.
- [8] Kawaguchi H, Vertes AA, Okino S, Inui M, Yukawa H. Engineering of a xylose metabolic pathway in *Corynebacterium glutamicum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(5): 3418-3428.
- [9] Yananse H, Miyawaki H, Sakurai M, Kawakami A, Matsumoto M, Haga Kenji, Kojima M, Okamoto K. Ethanol production from wood hydrolysate using genetically engineered *Zymomonas mobilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 94: 1667-1678.
- [10] Zhang M, Eddy C, Deanda K, Finkelstein M, Picataggio S. Metabolic engineering of a pentose metabolism pathway in ethanologenic *Zymomonas mobilis*. *Science*, 1995,

267 (5195) : 240-243.

- [11] Jojima T, Omumasaba CA, Inui M, Yukawa H. Sugar transporters in efficient utilization of mixed sugar substrates: current knowledge and outlook. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 85 (3) : 471-480.
- [12] Runquist D, Hahn-Hagerdal B, Radstrom P. Comparison of heterologous xylose transporters in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for Biofuels*, 2010, 3: 5.
- [13] Saloheimo A, Rauta J, Stasyk OV, Sibirny AA, Penttila M, Ruohonen L. Xylose transport studies with xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing heterologous and homologous permeases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 74 (5) : 1041-1052.
- [14] Desai TA, Rao CV. Regulation of arabinose and xylose metabolism in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76 (5) : 1524-1532.
- [15] Khankal R, Chin JW, Cirino PC. Role of xylose transporters in xylitol production from engineered *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 2008, 134 (3-4) : 246-252.
- [16] Sumiya M, Davis EO, Packman LC, McDonald TP, Henderson PJF. Molecular-genetics of a receptor protein for D-xylose, encoded by the gene *xylF* in *Escherichia coli*. *Receptors Channels*, 1995, 3: 117-128.
- [17] Davis EO, Henderson PJF. The cloning and DNA sequence of the gene *xylE* for xylose-proton symporter in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Biological Chemistry*, 1987, 262: 13928-13932.
- [18] Song S, Park C. Organization and regulation of the D-xylose operons in *Escherichia coli* K-12: XylR acts as a transcriptional activator. *Journal of Bacteriology*, 1997, 179 (22) : 7025-7032.
- [19] Schubert P, Krüger N, Steinbüchel A. Molecular analysis of the *Alcaligenes eutrophus* poly (3-Hydroxybutyrate) biosynthetic operon: identification of the N-terminus of poly (3-Hydroxybutyrate) synthase and identification of the promoter. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173 (1) : 168-175.
- [20] Fukui T, Ohsawa K, Mifune J, Orita I, Nakamura S. Evaluation of promoters for gene expression in polyhydroxyalkanoate-producing *Cupriavidus necator* H16. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 89 (5) : 1527-1536.
- [21] Pohlmann A, Fricke WF, Reinecke F, Kusian B, Liesegang H, Cramm R, Eitinger T, Ewering C, Potter M, Schwartz E, Strittmatter A, Voss I, Gottschalk G, Steinbüchel A, Friedrich B, Bowien B. Genome sequence of the bioplastic-producing “Knallgas” bacterium *Ralstonia eutropha* H16. *Nature Biotechnology*, 2006, 24 (10) : 1257-1262.
- [22] Bachmann BJ. Pedigrees of some mutant strains of *Escherichia coli* K-12. *Bacteriological Reviews*, 1972, 36 (4) : 525-557.
- [23] Simon R, Priefer U, Puhler A. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Nature Biotechnology*, 1983, 1: 784-791.
- [24] Quandt J, Hynes MF. Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in Gram-negative bacteria. *Gene*, 1993, 127: 15-21.
- [25] Kovach ME, Elezer PH, Hill DS, Robertson GT, Farris MA, Peterson KM. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene*, 1995, 166: 175-176.
- [26] Sambrook J, Russel DW. 分子克隆指南. 黄培堂, 等译. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [27] Peplinski K, Ehrenreich A, Doring C, Bomeke M, Reinecke F, Hutmacher C, Steinbüchel A. Genome-wide transcriptome analyses of the ‘Knallgas’ bacterium *Ralstonia eutropha* H16 with regard to polyhydroxyalkanoate metabolism. *Microbiology*, 2010, 156: 2136-2152.
- [28] Bradford MM. Photometric methods for protein determination. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72: 248-254.
- [29] Dische Z, Borenfreud E. A new spectrophotometric method for the detection and determination of keto sugars and trioses. *Journal of Biological Chemistry*, 1951, 912: 583-587.
- [30] Shamana DK, Sanderson KE. Uptake and catabolism of D-xylose in *Salmonella typhimurium* LT2. *Journal of Bacteriology*, 1979, 139 (1) : 64-70.
- [31] Zhao Z, Ding JY, Li T, Zhou NY, Liu SJ. The *ncgl1108* (PheP (Cg)) gene encodes a new l-Phe transporter in *Corynebacterium glutamicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 90 (6) : 2005-2013.
- [32] Le Meur S, Zinn M, Egli T, Thony-Meyer L, Ren Q. Production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates by sequential feeding of xylose and octanoic acid in engineered *Pseudomonas putida* KT2440. *BMC Biotechnology*, 2012, 12: 53.

- [33] RIIS V, MAI W. Gas chromatographic determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass after hydrochloric acid propanolysis. *Journal of Chromatography*, 1988, 445: 285-289.
- [34] Raberg M, Peplinski K, Heiss S, Ehrenreich A, Voigt B, Döring C, Bömeke M, Hecker M, Steinbüchel A. Proteomic and transcriptomic elucidation of the mutant *Ralstonia eutropha* G⁺ 1 with regard to glucose utilization. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77 (6) : 2058-2070.
- [35] Raberg M, Kaddor C, Kusian B, Stahlhut G, Budinova R, Kolev N, Bowien B, Steinbüchel A. Impact of each individual component of the mutated PTS^{Nag} on glucose uptake and phosphorylation in *Ralstonia eutropha* G⁺ 1. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 95: 735-744.

Engineering of a D-xylose metabolic pathway in *Ralstonia eutropha* W50

Kai Liu^{1,2}, Guiming Liu¹, Yingzi Zhang¹, Jiuyuan Ding¹, Weiqi Weng^{1*}

¹Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

²College of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: [Objective] This study aimed to broaden the substrate spectrum of *Ralstonia eutropha* W50 to use D-xylose, which can produce poly- β -hydroxybutyrate (PHB) at a high level. [Methods] The D-xylose transporter gene *xylE* from *Escherichia coli* K-12 W3110 was cloned by PCR technique and integrated into the *R. eutropha* W50 chromosome. The recombinant strain W50-E was obtained. The D-xylose catabolic genes *xylAB* from *E. coli* K-12 W3110 and the promoter of PHA synthase gene *phaCI* from *R. eutropha* H16 were cloned into pBBR1MCS to construct a recombinant plasmid. The plasmid was transformed into *R. eutropha* W50 and W50-E to generate the recombinant strains W50-AB and W50-EAB respectively. The characteristics of D-xylose utilization by W50-AB and W50-EAB were investigated. [Results] The expression of *xylA* and *xylB* genes in *R. eutropha* W50 was confirmed by enzyme assay. The recombinant strain W50-AB could grow on 0.1 mol/L D-xylose with the maximum specific growth rate of 0.025 h⁻¹, but no growth and D-xylose consumption were observed when cultivated on 0.01 mol/L D-xylose. The recombinant strain W50-EAB exhibited a faster growth than W50-AB on 0.1 mol/L D-xylose, with the maximum specific growth rate of 0.035 h⁻¹. Furthermore, it exhibited a slow but defined growth and D-xylose consumption on 0.01 mol/L D-xylose. The PHB content assay showed that both recombinant strains accumulated a small amount of PHB, with a proportion of 15.07 ± 1.01% and 15.07 ± 1.64% on the basis of dry cell weight respectively, by using D-xylose (0.1 mol/L) as substrate. And their final D-xylose-PHB conversion rates were 0.0920 g·g⁻¹ and 0.0838 g·g⁻¹ respectively, which were much lower than their glucose-PHB conversion rates (>0.22 g·g⁻¹). However, the recombinant strains W50-AB and W50-EAB exhibited better fermentation performance and more PHB accumulation when using glucose (0.01 mol/L) and D-xylose (0.09 mol/L) mixed sugars as fermentative substrate. [Conclusion] The recombinant strain W50-AB can metabolize D-xylose by the expression of *xylAB* genes, and the further expression of *xylE* gene is able to improve its D-xylose consumption rate. Meanwhile, the two recombinant strains can accumulate a small amount of PHB by using D-xylose as the sole carbon source.

Keywords: *Ralstonia eutropha* W50, D-xylose metabolism, poly- β -hydroxybutyrate (PHB), transporter

(本文责编:王晋芳)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-10-64807360; E-mail: wengwq@im.ac.cn